

Identifikasi Entomopatogen Bakteri Merah pada Wereng Batang Coklat (*Nilaparvata lugens* Stål.)

Tri P. Priyatno^{1*}, Yohana A. Dahliani², Yadi Suryadi¹, I Made Samudra¹, Dwi N. Susilowati¹, Iman Rusmana², Baskoro S. Wibowo³, dan Cahyadi Irwan³

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: isdihar@yahoo.co.uk

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor

³Balai Peramalan dan Pengamatan Hama dan Penyakit Tanaman, Jatisari, Subang, Jawa Barat

Diajukan: 6 Agustus 2011; Diterima: 30 september 2011

ABSTRACT

Identification of Entomopathogenic Red Bacterial from Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål.). Tri P. Priyatno, Yohana A. Dahliani, Yadi Suryadi, I Made Samudra, Dwi N. Susilowati, Iman Rusmana, Baskoro S. Wibowo, and Cahyadi Irwan. Red bacteria isolated from brown planthopper (BPH) has been proven pathogenic against BPH and others insects. Application of 10^6 to 10^7 cells/ml of red bacteria caused 65.6-78.2% mortality of BPH. The 50% effective concentration (EC_{50}) and lethal time of red bacteria against BPH is 2.8×10^5 cells/ml and 6.8 days, respectively. Based on phenotypic characters tested on GN MicroPlate™ Biolog kit and 16S rRNA sequence analysis, red bacteria was identified as *Serratia marcescens* with 99% similarity. Red pigment produced by *S. marcescens* strain BPH is secondary metabolite determined as prodigiosin showing bactericidal activities against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. We concluded that *S. marcescens* did not only potent as biocontrol agent to BPH, but also it can be used to control plant pathogenic bacteria.

Keywords: Entomopathogenic bacteria, *Nilaparvata lugens*, *Serratia marcescens*, prodigiosin.

ABSTRAK

Identifikasi Entomopatogen Bakteri Merah pada Wereng Batang Coklat (*Nilaparvata lugens* Stål.). Tri P. Priyatno, Yohana A. Dahliani, Yadi Suryadi, I Made Samudra, Dwi N. Susilowati, Iman Rusmana, Baskoro S. Wibowo, dan Cahyadi Irwan. Bakteri merah yang diisolasi dari wereng batang coklat (WBC) terbukti bersifat patogenik terhadap WBC dan serangga lainnya. Sel bakteri yang diaplikasikan dengan konsentrasi 10^6 - 10^7 sel/ml mematikan WBC 65,6-78,2%. Konsentrasi dan waktu yang efektif mematikan sekitar 50% WBC masing-masing adalah $2,8 \times 10^5$ sel/ml dan 6,8 hari. Berdasarkan uji karakter fenotipe dengan menggunakan kit GN MicroPlate™ Biolog dan analisis sekuens 16S rRNA, bakteri merah diidentifikasi sebagai *Serratia marcescens* dengan tingkat kesamaan 99%. Pigmen merah yang dihasilkan oleh *Serratia marcescens* strain WBC adalah suatu metabolit sekunder yang diketahui sebagai prodigiosin yang menunjukkan aktivitas antibakterial sebagaimana telah diujikan terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Oleh karena itu, kami simpulkan bahwa *S. marcescens* tidak

hanya potensial sebagai agensia pengendalian hayati WBC, tetapi juga dapat digunakan untuk mengendalikan bakteri patogen tanaman.

Kata kunci: Bakteri entomopatogenik, *Nilaparvata lugens*, *Serratia marcescens*, prodigiosin.

PENDAHULUAN

Wereng batang coklat (WBC, *Nilaparvata lugens* Stål.) yang merupakan salah hama utama tanaman padi mempunyai banyak musuh alami potensial yang dapat dimanfaatkan untuk program pengendalian secara terpadu. Salah satu entomopatogen potensial tetapi belum banyak diteliti dan dimanfaatkan untuk pengendalian WBC adalah bakteri merah. Sebenarnya infeksi bakteri pada WBC yang mempunyai tipe pen-cucuk-pengisap masih menjadi polemik, karena infeksi bakteri entomopatogen, seperti *Bacillus thuringiensis* dan *Serratia entomophila* terjadi melalui mulut dengan termakan. Tetapi hasil uji pastulat Koch membuktikan bahwa bakteri merah bersifat patogenik terhadap WBC (Wibowo *et al.*, 2002). Ini menunjukkan bahwa infeksi bakteri dapat terjadi melalui stilet, ketika serangga sedang mencucuk dan menghisap cairan tanaman. Gejala WBC yang mati terinfeksi adalah busuk basah dengan warna merah pada tubuhnya. Bakteri yang berhasil diisolasi juga menunjukkan koloni berwarna merah pada media Luria Bertani Agar (LBA). Bakteri merah juga dilaporkan bersifat patogenik terhadap *Spodoptera exigua*, *Plutella xylostella*, *Crociodolomia binotalis*, kutu daun mangga (*Rastrococcus* sp.), dan belalang berkembar (Wibowo *et al.*, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri merah mempunyai sebaran inang yang cukup luas pada serangga sasaran.

Bakteri endosimbion yang juga merupakan patogen lemah pada WBC sudah diidentifikasi oleh Wang *et al.* (2003) sebagai *Serratia*. Bakteri ini kurang patogenik, jika berada di dalam saluran pencernaan, tetapi menjadi sangat patogenik jika berada di dalam haemolimfa serangga dengan gejala kematian septisemia. Bagaimana bakteri yang tercerna oleh serangga

dapat masuk ke dalam haemolimfanya masih belum banyak diketahui. Diduga bakteri masuk ke dalam hemocoel ketika serangga dalam keadaan tertekan atau terluka. Hal ini ditunjukkan oleh tingkat kematian WBC yang rendah waktu serangga dalam kondisi normal. Sedangkan pada waktu serangga mengalami tekanan kuat akibat suhu lingkungan tinggi, kualitas pakan rendah, populasi berlimpah, luka atau faktor-faktor lain, tingkat kematian WBC menjadi sangat tinggi.

Serratia adalah bakteri gram negatif famili Enterobacteriaceae yang memiliki flagella peritrik, sehingga bersifat motil. Habitat *Serratia* terutama di air dan tanah, pada permukaan daun, serta di dalam tubuh serangga, hewan, dan manusia (Khanafari *et al.*, 2006). Pemanfaatan bakteri merah sebagai agensia pengendali hayati belum banyak dilakukan, karena selain dianggap sebagai patogen lemah, masalah keamanan penggunaannya juga masih dipertanyakan, sebab *S. marcescens* juga dikenal sebagai patogen oportunistik pada manusia. Di New Zealand, dua bakteri entomopatogen *non-spore forming* dari genus *Serratia*, yaitu *S. entomophila* dan *S. proteamaculans*, telah berhasil dikembangkan menjadi biopestisida yang efektif untuk mengendalikan grass grub (*Costelytra zealandica*). Bakteri *non-spore forming* yang tidak bersifat aktif menyerang, mungkin dapat masuk ke dalam hemocoel ketika serangga dalam keadaan tertekan atau terluka (Hurst *et al.*, 2000). Menurut Hurst *et al.* (2000), faktor virulensi *S. entomophila* berada di dalam plasmidnya yang berukuran 150 kb. Plasmid *S. entomophila* membawa empat gen penyandi toksin yang sangat toksik terhadap serangga. Gen-gen tersebut dapat menjadi sumber gen untuk pengembangan tanaman padi tahan WBC melalui pendekatan molekuler.

Bakteri merah yang diisolasi dari wereng coklat memiliki bentuk koloni yang cembung dan menghasilkan pigmen merah pada media agar yang mengandung senyawa fosfat, karbonat, dan besi. Pigmen merah merupakan salah satu indikasi produksi prodigiosin pada genus *Serratia*. Pigmen merah yang dihasilkan oleh *Serratia* merupakan metabolit sekunder yang dikenal sebagai prodigiosin yang tergolong dalam famili pigmen merah *tripyrrole* yang umumnya mengandung 4-methoxy, ring 2-2 *bipyrrrole* (Giri *et al.*, 2004). Prodigiosin adalah metabolit sekunder multi aspek yang mempunyai aktivitas antibakterial, antifungal, dan antiprotozoal, bersifat *cytotoxic*, antitumor, antimalaria, antidiabetes, antioksidan, obat-obatan antiinflammatory nonsteroidal, dan dapat digunakan sebagai pewarna sutera dan wol (Khanafari *et al.*, 2006).

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri merah hasil isolasi dari WBC mati dan mengkarakterisasi pigmen merah yang dihasilkannya.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan Uji Patogenisitas Bakteri Merah

Isolasi bakteri

Bakteri merah diisolasi dari WBC koloni Cisadane yang mati dengan gejala tubuh berwarna merah. Sekor serangga yang telah mati dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan ditambah 300 μ l NaCl 0,85%, kemudian divortek selama 1 menit. Selanjutnya, 100 μ l suspensi bakteri disebarkan secara merata pada media LBA di dalam cawan petri. Setelah diinkubasikan selama 48 jam pada suhu ruangan, koloni tunggal bakteri berwarna merah yang tumbuh diisolasi dan dipelihara pada media LBA miring di dalam tabung reaksi dan diberi kode Sm201102. Biakan diremajakan setiap 2 minggu sekali.

Uji patogenisitas bakteri merah terhadap WBC

Isolat bakteri merah (Sm201102) diuji patogenisitasnya terhadap nimfa WBC populasi Cisadane instar 2-3. Pengujian dilakukan pada tanaman padi varietas Cisadane yang ditanam di dalam ember plastik ukuran 1 liter di rumah kaca. Suspensi bakteri dibuat dari biakan umur 24 jam pada media LBA sebagai inokulum dengan menambahkan air steril dan kerapatan selnya ditetapkan 10^4 - 10^8 sel/ml. Pada umur 35 hari setelah tanam (HST), tanaman padi diinokulasi dengan menyemprotkan 5 ml inokulum bakteri secara merata pada setiap rumpun yang berisi 5 tanaman. Tanaman padi yang digunakan sebagai kontrol hanya disemprot dengan akuades steril. Setelah penyemprotan, tanaman dikurung dengan plastik milar, kemudian diinfestasi dengan 20 ekor nimfa WBC. Mortalitas WBC diamati setiap hari selama 15 hari. Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan 5 ulangan. Nilai kerapatan sel dan waktu yang efektif mematikan 50% WBC ditentukan dengan analisis Probit.

Uji sensitivitas bakteri merah terhadap antibiotik

Bakteri merah diuji sensitivitasnya terhadap lima jenis antibiotik dengan metode *agar dilution* pada media LBA. Setiap antibiotik diuji dengan konsentrasi 25 dan 50 μ g/ml. Bakteri yang mampu tumbuh pada media yang mengandung antibiotik dinyatakan sebagai resisten, sedangkan yang tidak tumbuh dianggap sensitif. Pengamatan pertumbuhan bakteri dilakukan 48 jam setelah inkubasi pada suhu ruangan.

Identifikasi Isolat Bakteri Merah

Identifikasi bakteri merah dilakukan dengan tiga cara, yaitu: (1) uji reaksi biokimia; (2) uji kemiripan 16S DNA ribosomal, dan (3) analisis filogenetik.

Uji reaksi biokimia

Pengujian merah dilakukan dengan menggunakan kit GN MicroPlate™ Biolog (Hayward, USA). Isolat bakteri yang diuji dibiakkan dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml media LB cair dan diinkubasikan dalam *orbital shaker* (75 rpm) selama 16 jam pada suhu ruangan. Kemudian sel bakteri dipanen dengan cara disentrifuse 10.000 rpm selama 5 menit dan dicuci dengan larutan NaCl 0,85% tiga kali untuk menghilangkan residu media. Pelet bakteri disuspensikan dalam 0,85% NaCl dan dibuat pengenceran dengan nilai $OD_{600} = 0,5$ menggunakan spektrofotometer (Hitachi U-2000). Selanjutnya, 150 μ l suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam setiap sumuran kit GN MicroPlate™ Biolog. Penampilan fenotipik dan reaksi biokimia bakteri diamati 24 jam setelah inkubasi pada suhu 28°C. Reaksi positif ditunjukkan oleh perubahan warna biakan menjadi ungu yang dibaca secara manual, sedangkan reaksi negatif tidak menunjukkan perubahan warna.

Uji kemiripan 16S rRNA ribosomal

Identifikasi lebih lanjut dilakukan dengan mengamplifikasi dan mensekuen gen yang menyandi 16S rRNA menggunakan primer spesifik. Isolasi/ekstraksi 16S DNA dilakukan dengan membiakkan bakteri merah di dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml media LB cair (tryptose 1%, ekstrak khamir 0,5%, NaCl 1%) yang digoyang selama 18 jam dalam *orbital shaker* (75 rpm) pada suhu ruangan. Biakan disentrifuse 10.000 rpm selama 5 menit dan pelet bakterinya disuspensikan dalam tabung Eppendorf dengan menambahkan larutan bufer *Solution I* 150 μ l, kemudian ditambahkan *Solution II* 150 μ l, dicampur merata dengan menggoyang perlahan dan diinkubasi selama 5-20 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, 250 μ l *Solution III* ditambahkan ke dalam tabung Eppendorf, dikocok kuat dan disentrifuse 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan fenol dan larutan campuran kloroform-isoamil alkohol (24 : 1) masing-masing 100 μ l. Setelah digoyang perlahan, larutan disentrifuse 10.000 rpm selama 10 menit, supernatan jernih di bagian atas diambil 600 μ l, kemudian ditambahkan 600 μ l isopropanol. Selanjutnya suspensi disentrifuse kembali 10.000 rpm 10 menit, supernatan dibuang, peletnya dikeringkan, dan ditambahkan akuades 20 μ l.

Identifikasi bakteri merah berdasarkan sekuen nukleotida 16S DNA ribosomal dilakukan dengan sepasang primer 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) dan 1387R (GGGCGGA/TGTGTACAAGGC) menggunakan mesin PCR Thermal Cycler (Biometra, USA). Komposisi 20 μ l reaktan PCR terdiri atas 2 μ l 10X bufer PCR, 1,5 μ l 50 mM $MgCl_2$, 0,5 μ l 4 mM dNTP, 1 μ l 20 mM primer *forward*, 1 μ l 20 mM primer *reverse*, 0,5 μ l 5U Taq polymerase, dan 13,5 μ l akuades steril. Reaktan PCR ditempatkan dalam tabung mikrosentrifuge berukuran 200 μ l. Templat DNA untuk PCR menggunakan koloni tunggal bakteri merah dari biakan yang berumur 18 jam pada media LBA di dalam cawan petri. Mesin PCR dijalankan dengan program sebagai berikut: denaturasi awal DNA pada suhu 94°C selama 10 menit, denaturasi kedua 94°C 1 menit, *annealing* 50°C 45 detik, dan *extension* 72°C 1 menit 30 detik dengan siklus sebanyak 35 kali. Produk PCR dicek pada gel agarose yang dielektroforesis dengan 90 volt selama 30 menit dalam bufer TAE.

Hasil perunutan sekuen nukleotida 16S DNA ribosomal dianalisis dengan perangkat lunak Blastn yang terdapat dalam situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) untuk mengetahui tingkat kekerabatan terdekat dengan bakteri yang ada di dalam *Database GeneBank* (NCBI). Analisis tingkat kemiripan runutan DNA antarstrain dalam satu spesies dan antarspesies dalam satu genus digunakan program interaktif dengan mengirimkan urutan nukleotida DNA dalam format *Fasta* melalui internet dengan cara salin dan tempel pada kolom khusus yang telah disediakan oleh *GeneBank*. Selanjutnya, sekuen 16S DNA ribosomal dalam *GeneBank* yang mempunyai kekerabatan dengan sekuen 16S DNA ribosomal dari isolat bakteri yang diuji diambil untuk dianalisis pohon filogenetiknya.

Sekuensing DNA dilakukan dengan ABI PRISM 3070 DNA Sequencer. Reaksi sekuensing dibuat dengan ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, USA) sesuai dengan petunjuk. Reaktan sekuensing mengandung 200 ng DNA, 3,2 pmol primer, 1 μ l Big Dye Terminator Ready Reaction Mix, dan air destilasi steril yang ditambahkan hingga volume akhir menjadi 10 μ l. Sekuensing dijalankan dalam mesin PCR Thermal Cycler (Biometra, USA) sebanyak 35 siklus dengan program 96°C selama 30 detik, 50°C selama 5 detik and 60°C selama 1 menit. Selanjutnya, produk PCR dimurnikan dengan metode pengendapan etanol. Pada reaktan sekuensing ditambahkan 1 μ l 125 mM EDTA, 1 μ l 3 M sodium asetat pH 4, dan 25 μ l 100% etanol. Setelah diinkubasikan selama 15 menit pada suhu ruangan, campuran disentrifuse 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Pelet dicuci dua kali dengan 70% eta-

nol dan dikeringkan pada suhu 65°C selama 10 menit. Kemudian sampel DNA siap dikirim ke PT Genetika Science (1st Base) untuk disekuensing.

Analisis filogenetik dilakukan menggunakan program PHYLIP versi 3.6 (University of Washington). Sebelum analisis, runutan nukleotida semua isolat yang terpilih dimodifikasi dengan perangkat lunak (*software*) ClustalX 1.83 untuk menyamakan format runutannya. Matrik jarak genetik dihitung dengan menggunakan matrik parameter dalam program komputer DNAML. Analisis *bootstrap* dengan 1.000 ulangan dilakukan menggunakan program SEQBOOT dan konsensus pohon filogenetiknya dibuat dengan program CONSENSE. Pohon filogenetiknya digambarkan dengan program MEGA4 dalam paket program PHYLIP.

Ekstraksi Pigmen Merah dan Purifikasi Prodigiosin

Ekstraksi pigmen merah

Isolat bakteri merah dibiakkan dalam tabung Erlenmeyer 1.000 ml yang berisi 250 ml media LB cair. Media diinokulasi dengan 1 ml biakan *Serratia* yang berumur 16 jam yang sebelumnya telah disiapkan dalam media LB cair dan kepekataannya diukur menggunakan spektrofotometer (Hitachi U-2000) dengan nilai $OD_{600} = 0,5$. Biakan diinkubasi dalam *orbital shaker* (150 rpm) selama 5 hari pada suhu ruangan. Kemudian biakan disentrifuse pada kecepatan 5.000 rpm dengan suhu 4°C selama 20 menit untuk memisahkan supernatan dari pelet sel bakteri. Ekstraksi prodigiosin dari supernatan dilakukan dengan etil asetat menurut teknik Devaraj *et al.* (2009). Supernatan dimasukkan ke dalam tabung fraksi, ditambahkan 100 ml etil asetat, dan dikocok kuat hingga larutan bercampur merata. Kemudian suspensi didiamkan selama beberapa menit untuk memisahkan fraksi air dari etil asetat yang bercampur prodigiosin. Etil asetat yang mengandung prodigiosin dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 35°C selama 20 menit, selanjutnya prodigiosin dilarutkan dalam dimethyl sulfoxide (DMSO).

Purifikasi prodigiosin

Prodigiosin dimurnikan dengan menggunakan kolom gel silika dengan solven kloroform. Ekstrak prodigiosin dalam pelarut metanol dialirkan melalui kolom gel silika. Prodigiosin yang terperangkap dalam kolom gel silika dilepaskan dan dilarutkan dengan kloroform. Tingkat kemurnian prodigiosin dianalisis dengan spektrofotometer (Hitachi U-2000) dan kromatografi lapis tipis gel silika. Sebanyak 10 μ l suspensi prodigiosin ditetaskan pada lapisan gel silika di atas lempengan kaca dengan jarak 3 cm dari bagian ba-

wah dan dijalankan dengan pelarut amil asetat hingga pelarut mencapai batas 3 cm dari atas. Noda merah yang merupakan prodigiosin dihitung nilai RF-nya berdasarkan perbandingan nilai jarak yang ditempuh sampel dengan nilai jarak yang ditempuh pelarut. Analisis dengan spektrofotometer dilakukan dengan pelarut air yang bersifat asam (0,1 N HCl) dan basa (0,1 N NaOH). Sebanyak 20 μ l prodigiosin dimasukkan ke dalam 200 μ l pelarut dan dicampur merata. Nilai kerapatan optik (*optical density*, OD) prodigiosin diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang antara 400-600 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Uji Patogenisitas Bakteri Merah

Isolat bakteri merah berhasil diisolasi dari WBC asal Sukamandi yang mati (karkas) dan diberi kode Sm201102. Hasil uji patogenisitas menunjukkan bahwa bakteri merah isolat Sm201102 mengakibatkan kematian WBC populasi Cisadane. Kematian WBC mulai terjadi 4 hari setelah inokulasi (HSI) dan meningkat tajam pada 7 HSI (Gambar 1). Serangga yang mati menunjukkan warna merah pada tubuhnya. Hasil reisolasi memperoleh isolat bakteri yang sama, berwarna merah, memastikan bahwa bakteri yang menginfeksi dan menyebabkan kematian WBC adalah bakteri merah. Dengan demikian, hal ini juga membuktikan bahwa bakteri merah bersifat patogenik terhadap WBC. Hasil analisis probit menunjukkan bahwa konsentrasi bakteri yang efektif mematikan WBC sekitar 50% adalah 10^6 sel/ml. Waktu yang diperlukan untuk mematikan WBC 50% pada konsentrasi tersebut sekitar 6,8 hari. Pada 10 hari setelah aplikasi, isolat bakteri merah ini memiliki efektivitas terhadap WBC dengan tingkat mortalitas 65,6-78,2% pada aplikasi dengan kerapatan sel 10^6 - 10^7 sel/ml.

Patogenisitas bakteri merah diduga tidak terjadi melalui infeksi integumen, tetapi bakteri masuk melalui mulut, ketika serangga mencucuk dan menghisap cairan tanaman. Mulut WBC bertipe pencucuk pengisap dan rostrumnya yang muncul dari bagian posterior kepala digunakan sebagai pintu masuk sel bakteri yang berukuran sekitar 1-2 μ m. Uji patogenisitas yang dilakukan melalui pakan menunjukkan bahwa bakteri merah ini juga bersifat patogenik terhadap larva *Tenebrio molitor*, bahkan protein yang diekstraksi dari sel bakteri bersifat toksik (data tidak ditampilkan). Hal ini menunjukkan bahwa patogenisitas bakteri merah isolat Sm201102 bersifat oral dengan menghasilkan senyawa protein yang bersifat toksik.

Identifikasi Isolat Bakteri Merah

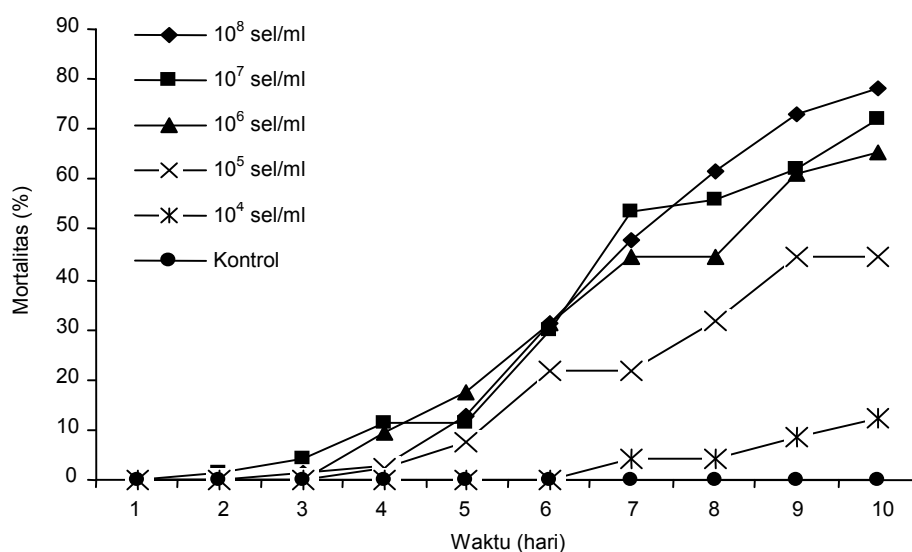
Uji fenotipe dan reaksi biokimia

Berdasarkan hasil uji fenotipik dan reaksi biokimianya, isolat bakteri merah Sm201102 merupakan bakteri gram negatif yang bersifat motil; koloninya berbentuk bulat cembung dan berukuran diameter 1-3 mm pada biakan umur 24 jam setelah inkubasi. Ukuran koloni bakteri menjadi lebih besar jika diinkubasikan lebih lama, karena sifat motilitas selnya. Warna merah koloni sudah mulai terlihat pada biakan umur 24 jam dan menjadi semakin nyata pada biakan umur >48 jam. Koloni bakteri yang berwarna putih juga sering dijumpai, terutama koloni tunggal yang letaknya terpisah jauh dari koloni lain. Menurut Thomson *et al.* (2000), warna merah ini muncul disebabkan oleh biosintesis pigmen merah yang berkaitan dengan mekanisme *quorum sensing*.

Isolat bakteri merah ini sensitif terhadap antibiotik streptomisin yang ditandai dengan tidak tumbuhnya isolat Sm201102 pada media LBA yang mengandung 25 dan 50 µg streptomisin/l, tetapi tahan terhadap

kloramfenikol, kasugamisin, dan rimfamisin (Tabel 1). Meskipun bakteri merah tahan terhadap kloramfenikol, tetapi pigmentasinya terhambat; hal ini ditunjukkan oleh warna merah koloninya yang menjadi berkurang. Bakteri ini bahkan tidak mampu menghasilkan pigmen merah pada konsentrasi kloramfenikol 1 µg/ml.

Karakteristik reaksi biokimia isolat bakteri merah Sm201102 berdasarkan pengujian dengan 95 senyawa biokimia menggunakan kit Biolog GN Microplate™ menunjukkan bahwa 94 pengujian bereaksi positif (Tabel 2). Reaksi negatif hanya terjadi pada α -keto butyric acid. Bakteri merah ini mampu memfermentasi semua jenis karbohidrat yang digunakan, meliputi D-fructose, L-fucose, D-galactose, gentiobiose, m-inositol, α -maltose, lactulose, D-lactose, D-mannitol, D-mannose, D-melibiose, dan α -D-glucose, serta semua jenis asam amino, termasuk L-ornithin. Berdasarkan analisis dengan Biolog GN database, isolat bakteri merah Sm201102 termasuk genus *Serratia*. Dalam Bergey's Manual (Holt *et al.*, 1994) disebutkan bahwa ciri biokimia genus *Serratia* yang membedakannya



Gambar 1. Grafik perkembangan mortalitas wereng batang coklat (WBC) yang mendapat perlakuan isolat bakteri merah Sm201102 dengan kerapatan 10^4 - 10^8 sel/ml sejak hari ke-1 hingga hari ke-10 inkubasi.

Tabel 1. Sensitivitas bakteri merah terhadap lima jenis antibiotik dengan konsentrasi 25 dan 50 µg.

Antibiotik	Konsentrasi (µg/ml)	
	25	50
Kloramfenikol	Resisten	Resisten
Kasugamisin	Resisten	Resisten
Rimfamisin	Resisten	Resisten
Streptomisin	Sensitif	Sensitif
Ampisilin	Resisten	Resisten

dari genus lain dalam famili yang sama, seperti *Enterobacter* adalah kemampuannya memanfaatkan sumber karbon L-fucose dan menghidrolisis tibutirin.

Uji kemiripan 16S DNA ribosomal (Amplifikasi 16S DNA ribosomal)

Identifikasi lebih lanjut dilakukan dengan mengamplifikasi dan mensekuen gen penyandi 16S rRNA menggunakan primer spesifik. Sekuen gen 16S rRNA merupakan salah satu marka genetik dari gen *housekeeping* yang paling umum digunakan dalam studi filogenik dan taksonomi bakteri, karena gen ini terdapat pada hampir semua jenis bakteri, fungsinya tidak berubah dari waktu ke waktu, dan ukuran gen 16S rRNA (≈ 1.500 bp) cukup besar untuk dianalisis *in silico* (Janda dan Abbott, 2007). Produk PCR hasil amplifikasi 16S rRNA dari bakteri merah berupa pita tunggal berukuran sekitar $\approx 1,3$ kb yang sesuai dengan perkiraan (Gambar 2).

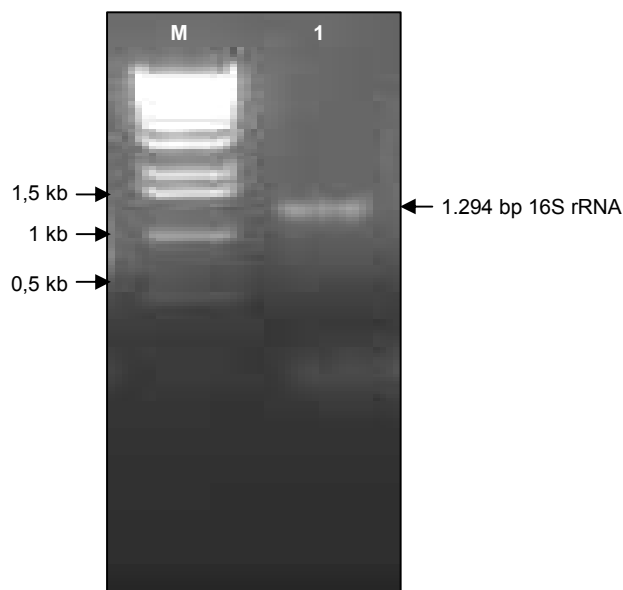
Fragmen DNA-nya diseku dengan primer sama dari dua arah yang berlawanan sebanyak dua kali dan sekuen nukleotidanya dianalisis dengan perangkat lunak *Alignment two sequences* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk memastikan tidak terjadi kesalahan sekuensing. Hasil sekuensing yang diperoleh berupa sekuen nukleotida dari 16S rRNA bakteri merah berukuran 1294 bp. Berdasarkan perbandingan sekuen 16S rRNA isolat bakteri merah dengan sekuen 16S rDNA bakteri lain yang terdapat dalam database GeneBank melalui analisis Blastn menunjukkan bahwa bakteri merah mempunyai tingkat kesamaan 99%

dengan *Serratia* sp. endosimbion WBC (No. akses GU124498) dan *S. marcescens* (No. akses HQ154570), serta 98% dengan *S. entomophila* (No. akses HM240853) (Tabel 3). Pada pohon filogenetik, bakteri merah berada dalam satu kelompok dengan *Serratia* sp. Endosimbion WBC satu kelompok dengan *S. marcescens* (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri merah Sm201102 yang menginfeksi WBC asal Sukamandi dapat dipastikan sebagai *S. marcescens*. Hasil identifikasi ini sama dengan yang dilaporkan Kim *et al.* (1998) di Korea.

Ekstraksi Pigmen Merah dan Purifikasi Prodigiosin

Ekstraksi pigmen merah

Pada umumnya, strain *S. Marcescens* yang diisolasi dari serangga dan lingkungan lainnya menghasilkan pigmen merah, sedangkan yang diisolasi dari manusia tidak berpigmen dan menjadi penyebab infeksi nosokomial (Mohan *et al.*, 2011). Pigmen merah yang dihasilkan oleh *S. marcescens* adalah metabolit sekunder yang dikenal sebagai prodigiosin. Prodigiosin merupakan antibiotik multifungsi yang memiliki aktivitas antibakterial, anti fungal, antiprotozoal, dan antitumor. Untuk mengidentifikasi lebih lanjut pigmen merah yang dihasilkan oleh isolat *S. marcessens* asal WBC dari Sukamandi telah berhasil diekstraksi dengan etil asetat. Etil asetat mampu memfraksinasi dan memisahkan pigmen merah dari media cair. Selanjutnya, pigmen dipekatkan dengan evaporator dan dimurnikan dengan kolom silika gel. Hasil deteksi dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa pigmen merah



Gambar 2. Hasil elektroforesis agarose gel produk PCR 16S rDNA bakteri merah. M = marker DNA 1 kb, 1 = 16S rRNA bakteri merah.

Tabel 2. Reaksi isolat bakteri merah Sm201102 terhadap 95 senyawa biokimia berdasarkan pengujian dengan kit Biolog GN Microplate™.

Uji	Reaksi	Uji	Reaksi
Cyclodextrin	+	Itaconic acid	[+]
Dextrin	+	α -keto butyric acid	-
Glycogen	+	α -keto glutaric acid	+
Tween 40	+	α -keto valeric acid	+
Tween 80	+	D,L-lactic acid	+
N-acetyl-D-galactosamine	+	Malonic acid	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	Propionic acid	+
Adonitol	+	Quinic acid	+
L-arabinose	+	Saccharic acid	+
D-arabitol	+	Sebacic acid	+
Cellobiose	+	Succinic acid	+
i-erythritol	+	Bromo succinic acid	+
D-fructose	+	Succinamic acid	+
L-fucose	[+]	Glucuronamide	+
D-galactose	+	Alaninamide	+
α -Gentiobiose	[+]	D-alanine	+
α -D-glucose	+	L-alanine	+
m-inositol	+	L-alanyl-glycine	+
α -D-lactose	+	L-asparagine	+
Lactulose	+	L-aspartic acid	+
Maltose	+	L-glutamic acid	+
D-mannitol	+	Glycyl-L-aspartic acid	+
D-Manose	+	Glycyl-Lglutamic acid	+
D-melibiose	[+]	L-histidine	+
β -methyl-D-glucoside	[+]	Hydroxy L-proline	+
D-psicose	+	L-leucine	+
D-raffinose	+	L-ornithine	+
L-rhamnose	+	L-phenylalanine	+
D-sorbitol	+	L-proline	+
Sucrose	+	L-pyrogutamic acid	+
D-trehalose	[+]	D-serine	+
Turanose	+	L-serine	+
Xylitol	+	L-threonine	+
Methyl pyruvate	[+]	D,L-camitine	+
Mono-methyl succinate	+	γ -amino butyric acid	+
Acetic acid	[+]	Urocanic acid	+
Cis-aconitic acid	+	Inosine	+
Citric acid	+	Uridine	+
Formic acid	+	Thymidine	+
D-galactonic acid	+	Phenyl ethylamine	+
D-galacturonic acid	+	Putrescine	+
D-gluconic acid	+	2-amino ethanol	+
D-glucosaminic acid	+	2,3-butanediol	+
D-glucuronic acid	+	Glycerol	+
α -hydroxybutyric acid	+	D,L- α -glycerol phosphate	+
β -hydroxybutyric acid	+	Glucose-1-phosphate	[+]
γ -hydroxybutyric acid	+	Glucose-6-phosphate	[+]
p-hydroxy phenylacetic acid	+		

+ = reaksi positif, [+] = reaksi positif lemah (moderat), - = reaksi negatif.

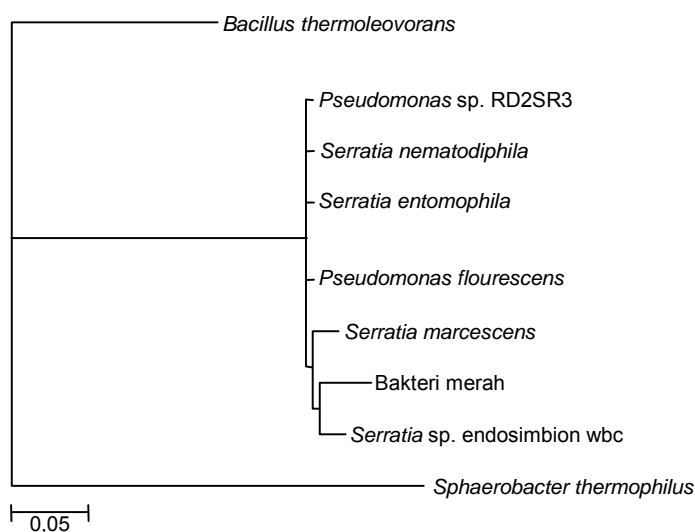
yang diekstraksi dari biakan *S. marcescens* isolat WBC mempunyai serapan panjang gelombang 540 nm dan 460 nm, masing-masing dalam pelarut metanol yang bersifat asam dan basa (Gambar 4A). Hasil ini sama dengan karakteristik prodigiosin *S. marcescens* yang dilaporkan Okamoto *et al.* (1998). Deteksi dengan kromatografi lapis menggunakan *eluent* amil asetat menunjukkan bahwa pigmen merah yang diuji mempunyai nilai $R_f = \pm 0,83$ (Gambar 4B).

Untuk memastikan bahwa pigmen merah dengan nilai $R_f = \pm 0,83$ adalah jenis prodigiosin yang bersifat bakterisidal, maka telah dilakukan uji bio-otografi. Hasil pengujian menunjukkan bahwa bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae* yang ditumbuhkan dalam agar *overlay* di atas lempeng kromatografi yang mengandung pigmen merah tidak mampu tumbuh hanya pada titik yang mengandung pigmen merah (Gambar 4C). Hal ini menunjukkan bahwa pigmen merah tersebut bersifat bakterisidal, sehingga dapat dipastikan bahwa pigmen

Tabel 3. Hasil analisis Blastn sekuen nukleotida 16S rDNA bakteri merah dengan sekuen yang terdapat dalam situs *National Center for Biotechnology Information*.

No. Akses	Deskripsi	Skor total	Identitas maksimum (%)	Nilai E
HQ242736.1	Gen 16S ribosomal RNA <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> isolat PSB23	2307	99	0
HQ143657.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia marcescens</i> strain YQH50	2307	99	0
HQ538684.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia</i> sp. bk_46	2307	99	0
HQ154570.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia marcescens</i> strain R9-8A	2307	99	0
HM640277.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia</i> sp. YF-2	2307	99	0
EU876700.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia marcescens</i> strain sls-1	2307	99	0
FJ853424.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia marcescens</i> strain MH6	2307	99	0
FJ495145.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia</i> sp. BSFC16	2307	99	0
FJ360761.3	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia</i> sp. PSB9	2307	99	0
FJ360759.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia marcescens</i> strain PSB19	2307	99	0
FJ009445.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Bacterium</i> enrichment culture klon JC1	2307	99	0
EU525929.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia marcescens</i> strain SDLH-I	2307	99	0
EF415649.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia marcescens</i>	2307	99	0
HQ917058.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia</i> sp. NB2	2302	98	0
JF206698.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>uncultured</i> bacterium klon ncd2365e07c2	2302	98	0
JF138992.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>uncultured</i> bacterium klon ncd1613a08c1	2302	98	0
HM240853.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia entomophila</i> strain M6	2302	98	0
HM136578.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia</i> sp. BL2	2302	98	0
GQ465847.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia marcescens</i> strain SB08	2302	98	0
GQ417536.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>uncultured</i> <i>Serratia</i> sp. klon F3jan.	2302	98	0
GQ416504.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>uncultured</i> <i>Serratia</i> sp. klon F7may2.65	2302	98	0
GQ165813.1	Sekuen parsial gen 16S RNA ribosomal <i>Serratia</i> sp. XRK6	2302	98	0

Nilai E = nilai ekspektasi.

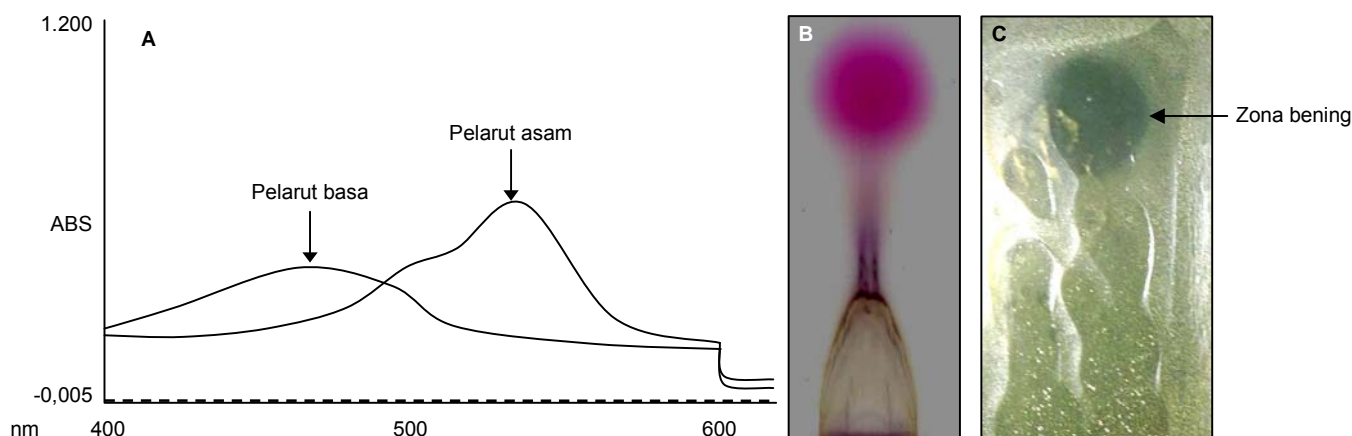


Gambar 3. Pohon filogenetik bakteri merah yang dianalisis dengan program PHYLIP versi 3.6.

merah yang dihasilkan oleh *S. marcescens* isolat WBC asal Sukamandi adalah jenis prodigiosin yang memiliki aktivitas antibakterial.

Prodigiosin belum pernah dilaporkan bersifat insektisidal dan menentukan virulensi *S. marcescens* terhadap serangga, tetapi aplikasi prodigiosin yang dikombinasi dengan kristal toksin *Bacillus thuringiensis* (Bt) mampu menunda perkembangan resistensi *Spodoptera litura* terhadap Bt (Asano *et al.*, 1999). Faktor virulensi pada *S. entomophila* and *S. protea-*

maculans terhadap serangga terletak dalam plasmid pADAP (*amber disease-associated plasmid*, 153 kb) yang membawa tiga gen penyandi kompleks toksin, yaitu *sepABC* (*S. entomophila* untuk pathogenesis) (Hurst *et al.*, 2000). Produk protein dari *sepABC* mempunyai kesamaan sekuen asam aminonya dengan toksin insektisidal yang dihasilkan oleh *Photobacterium luminescens* (Bowen *et al.*, 1998), *Xenorhabdus nematophilus* (Morgan *et al.*, 2001), *Yersinia pestis* C092 (Parkhill *et al.*, 2001), *Pseudomonas syringae* pv.



Gambar 4. A = profil pigmen merah hasil deteksi dengan spektrofotometer; B = kromatografi lapis tipis silika gel (B); C = uji bio-otografi menggunakan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

tomato DC3000 (Buell *et al.*, 2003), *Serratia* sp. (Hurst *et al.*, 2000; Dodd *et al.*, 2006) dan *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (Vasconcelos *et al.*, 2003), yang dikenal dengan nama kompleks toksin (Toxin complex, Tc), tetapi gen penyandi Tc berada dalam DNA genomnya. Kompleks toksin memiliki berat molekul tinggi (≈ 1 MDa) dan menunjukkan aktivitas insektisidal terhadap serangga dari Coleoptera, Dictyoptera, Hymenoptera, and Lepidoptera (Bowen *et al.*, 1998). Kompleks toksin tersusun atas empat kompleks toksin (*Tca*, *Tcb*, *Tcc*, dan *Tcd*) yang masing-masing dikodekan oleh empat lokus gen, yaitu *Tca*, *Tcb*, *Tcc*, dan *Tcd*. Kompleks toksin *Tca* dan *Tcd* bersifat oral terhadap *Manduca sexta* (Waterfield *et al.*, 2001) serta *Leptinotarsa decemlineata* dan *Bemisia tabaci* (Blackburn *et al.*, 1998). Kompleks toksin *Tca* dan *Tcd* potensial untuk menjadi salah satu kandidat pengganti toksin *B. thuringiensis* (Bt) dalam pengembangan tanaman transgenik tahan serangga hama.

Meskipun *S. marcescens* mempunyai potensi sebagai agensia pengendalian hayati, tetapi pemanfaatan bakteri merah untuk pengendalian wbc belum dilakukan. Hal ini diduga disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu (1) *S. marcescens* adalah patogen lemah yang hanya bersifat patogenik ketika serangga dalam keadaan tertekan sehingga penggunaan untuk pengendalian WBC tidak akan efektif; (2) *S. marcescens* telah dilaporkan sebagai patogen oportunist pada manusia, sehingga pemanfaatannya dikhawatirkan membahayakan organisme bukan sasaran, dan (3) penelitian tentang faktor-faktor virulensi isolat *S. marcescens* Sm201102 terhadap WBC belum dilakukan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Isolat bakteri merah dengan kode Sm201102 telah diperoleh dari WBC mati (kerakas WBC) yang berasal dari Sukamandi Isolat bakteri ini bersifat patogenik terhadap WBC, secara oral, dengan menghasilkan toksin yang bersifat insektisidal. Hasil identifikasi berdasarkan fenotipe dan reaksi biokimia menggunakan kit Biolog GN Microplate™ dan uji kemiripan 16s DNA menunjukkan bahwa isolat Sm201102 adalah *S. marcescens*. Isolat *S. marcescens* Sm201102 menghasilkan pigmen merah prodigiosin yang juga memiliki aktivitas antibakterial.

S. marcescens memiliki kisaran inang yang luas, tidak terbatas pada serangga hama, tetapi juga bakteri patogen tanaman, sehingga pemanfaatannya untuk pengendalian hayati tidak terbatas pada pengendalian terhadap serangga hama, tetapi juga untuk mengendalikan bakteri patogen tanaman, seperti penyakit hawar daun padi atau kresek yang disebabkan oleh *X. oryzae* pv. *oryzae*, karena *S. marcescens* menghasilkan pigmen merah prodigiosin yang memiliki aktivitas antibakterial. Identifikasi dan karakterisasi gen penyandi protein insektisidal yang dihasilkan *S. Marcescens* perlu dilakukan, karena berpotensi untuk dijadikan sumber gen ketahanan dalam pengembangan tanaman transgenik tahan serangga hama dan penyakit tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Asano, S., K. Ogiwara, Y. Nakagawa, K. Suzuki, H. Hori, and T. Watanabe. 1999. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* enhances the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin (Cry1C) against common cutworm, *Spodoptera litura*. J. Pestic. Sci. 24:381-385.

- Blackburn, M., E. Golubeva, D. Bowen, and R.H. Effrench-Constant. 1998. A novel insecticidal toxin from *Photobacterium luminescens*, Toxin complex a (Tca) and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8):3036-41.
- Bowen, D., T.A. Rocheleau, M. Blackburn, O. Andreev, E. Golubeva, R. Bhartia, and R.H. Effrench-Constant. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photobacterium luminescens*. *Science* 280:2129-2132.
- Buell, C.R., V. Joardar, and M. Lindeberg. 2003. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10181-10186.
- Davaraj, N.J., D. Dharumaduar, T. Noordin, and P. Annamalai. 2009. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and its cytotoxicity activities. *J. Pharmacy Res.* 2(4):590-593.
- Dodd, S.J., M.R. Hurst, T.R. Glare, M. O'Callaghan, and C.W. Ronson. 2006. Occurrence of *sep* insecticidal toxin complex genes in *Serratia* spp. and *Yersinia frederiksenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6584-6592.
- Giri, A.V., N. Anandkumar, G. Muthukumar, and G. Pennathur. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology* 4:1-10.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.S. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Mergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Maryland, USA. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hurst, M.R., T.R. Glare, A. Jackson, and C.W. Ronson. 2000. Plasmid located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photobacterium luminescens*. *J. Bacteriol.* 182:5127-5138.
- Janda, J.M. and S.L. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identifications in the diagnostic laboratories: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45(9):2761-2761.
- Khanafari, A., M.M. Assadi, and F.A. Fakhr. 2006. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Biol. Sci.* 6:1-13.
- Kim, C.H., S.W. Kim, and S.I. Hong. 1998. Production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95 and its cultural properties. *Korea J. Biotechnol. Bioeng.* 13:431-437.
- Mohan, M., G. Selvakumar, S.N. Sushil, J.C. Bhatt, dan H.S. Gupta. 2011. Entomopathogenicity of endophytic *Serratia marcescens* strain SRM against larvae of *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera). *World J. Microbiol. Biotechnol.* Published online 07 April 2011.
- Morgan, J.A., M. Sargent, D. Ellis, M. Ousley, and P. Jarret. 2001. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMF1296. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2062-2069.
- Okamoto, H., Z. Sato, M. Sato, Y. Koiso, S. Iwasaki, and M. Isaka. 1998. Identification of antibiotic red pigments of *Serratia marcescens* F1-1, a biocontrol agent of damping-off of cucumber, and antimicrobial activity against other plant pathogens. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64:294-298.
- Parkhill, J., B.W. Wren, N.R. Thomson, R.W. Titball, M.T. Holden, M.B. Prentice, M. Sebaihia, K.D. James, C. Churcher, K.L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S.D. Bentley, K. Brooks, A.M. Cerdeno-Tarraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R.M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A.V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P.C. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B.G. Barrell. 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413:523-527.
- Thomson, N.R., M.A. Crow, S.J. McGowan, A. Cox, and G.P. Salmond. 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol. Microbiol.* 36:539-556.
- Vasconcelos, A.T.R., D.F. Almeida, F.C. Almeida, L.G.P. Almeida, R. Almeida, J.A. Alves-Gomes, E.M. Andrade, R.V. Antônio, J. Araripe, M.F.F. Araújo, S. Astolfi-Filho, V. Azevedo, A.J. Baptista, L.A.M. Bataus, J.S. Batista, A. Beló, C. van den Berg, J. Blamey, M. Bogo, S. Bonatto, J. Bordignon, C.A. Brito, M. Brocchi, H.A. Burity, A.A. Camargo, D.D.P. Cardoso, N.P. Carneiro, D.M. Carraro, C.M.B. Carvalho, J.C.M. Cascardo, B.S. Cavada, L.M.O. Chueire, T.B. Creczynski-Pasa, N. Duran, N. Fagundes, C.L. Falcão, F. Fantinatti, I.P. Farias, M.S.S. Felipe, L.P. Ferrari, J.A. Ferro, M.I.T. Ferro, G.R. Franco, N.S.A. Freitas, L.R. Furlan, R.T. Gazzinelli, E.A. Gomes, P.R. Gonçalves, T.B. Grangeiro, D. Grattapaglia, E.C. Grisard, C.T. Guimarães, E.S. Hanna, M. Hungria, S.N. Jardim, J. Laurino, L.C.T. Leoi, L.F.A. Lima, M.F. Loureiro, M.C.C.P. Lyra, M. Macedo, H.M.F. Madeira, G.P. Manfio, A.Q. Maranhão, W.S. Martins, S.M.Z. di Mauro, S.R.B. Medeiros, R.V. Meissner, M.A.M. Moreira, F.F. Nascimento, M.F. Nicolas, J.G. Oliveira, S.C. Oliveira, R.F.C. Paixão, J.A. Parente, F.O. Pedrosa, S.D.J. Pena, J.O. Pereira, M. Pereira, L.S.R.C. Pinto, L.S. Pinto, J.I.R. Porto, D.P. Potrich, C.E. Ramalho-Neto, A.M.M. Reis, L.U. Rigo, E. Rondinelli, E.B.P. Santos, F.R. Santos, M.P.C. Schneider, H.N. Seuanez, A.M.R. Silva, A.L.C. Silva, D.W. Silva, R. Silva, I.D.C. Simões, D. Simon, C.M.A. Soares, R.B.A. Soares, E.M. Souza, K.R.L. Souza, R.C. Souza, M.B.R. Steffens, M. Steindel, S.R. Teixeira, T. Urmenyi, A. Vettore, R. Wasseem, A. Zaha, and A.J.G. Simpson. 2003. Complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:11660-11665.
- Wang, G., F. Lai, J. Luo, and Q. Fu. 2003. Diversity of endosymbiotic bacteria of (*Nilaparvata lugens* Stål.) (rice brown planthopper). *China National Rice Research Institute Newsletter*, Hangzhou Tiyyuchang.

Waterfield, N., A. Dowling, S. Sharma, P.J. Daborn, U. Potter, and R.H. Effrench-Constant. 2001. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5017-5024.

Wibowo, B.S., L. Retnowati, A. Sutaryat, C. Irwan, dan Y. Kurniadi. 2002. Uji Lapang Bakteri Merah terhadap Wereng Batang Coklat (Di Daerah Endemis). Laporan Kajian. Balai Penelitian Organisme Pengganggu Tanaman, Jatisari, Tahun 2002. 21 hlm.
